

고추의 sesquiterpene cyclase promoter-cinnamic acid 4-hydroxylase chimeric gene의 담배에서 발현

이경민 · 윤용휘 · 김길웅 · 이인중 · 신동현*

경북대학교 농업생명과학대학 식물생명과학부

Received June 29, 2004 / Accepted August 9, 2004

Expression of Cinnamic Acid 4-Hydroxylase Chimeric Gene Fused with Sesquiterpene Cyclase Promoter from Hot Pepper in Tobacco. Lee, Kyung-Min, Yong-Hwi Yoon, Kil-Ung Kim, In-Jung Lee and Dong-Hyun Shin*. *Department of Agronomy, College of Agriculture and Life Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea* – Tobacco transformants harboring cinnamic acid 4-hydroxylase gene (C4H) fused with sesquiterpene cyclase promoter was developed in order to regulate biosynthesis of phenolic compounds by the expression of the introduced gene. Twenty transformants for each specific promoter were used to analyze the incorporation of the chimeric genes by PCR and Southern blot analysis. PCR products of NPT II (neomycin phosphotransferase) gene (553bp) were detected in the transgenic tobacco plants. The incorporation of the chimeric gene was confirmed in the Southern blot analysis. C4H activity in the transgenic plants was elevated by UV-irradiation and its level was higher compared to that of control plants.

Key words – cinnamic acid 4-hydroxylase, cinnamic acid 4-hydroxylase activity, sesquiterpene cyclase promoter, transgenic tobacco

최근 식물분자생물학 기술 중에서 가장 주목받는 연구 분야의 하나는 자기방어능력을 지닌 식물의 육성이라고 할 수 있다. 환경스트레스에 관련된 유전자를 분리하고 스트레스에 특이적으로 유도되는 promoter를 제작하고 이것을 형질 전환기법으로 식물체에 도입함으로써 식물체내 생체방어물질의 생성을 자가 조절하는 작물을 개발하여 농약사용을 획기적으로 줄일 수 있는 친환경적 기술의 개발이 요청되고 있다.

식물은 UV나 상처, 병원체 등 다양한 환경스트레스에 의해 세포내에 phenylpropanoid pathway 상에서 생성되는 물질을 축적한다[6,13]. Phenylpropanoid pathway에서 생합성되는 여러 가지 물질은 식물의 자기방어(self-defense) 기능에 관여하며, 식물 종 및 종내 조직에 따라 기능들이 다양하게 나타난다[19]. 그러므로 이런 기능을 조절할 수 있는 식물과 관련된 여러 대사경로 및 조절과정에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. Phenylpropanoid 생합성 경로로 생성되는 방어물질은 cinnamic acid, p-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid 등이 있고, 이 물질들의 생합성에는 많은 효소(Enzyme)들이 관여되어 있다. 이 물질들은 생화학적 기능뿐만 아니라 방어기작(defense mechanism)에서도 광범위하게 연구되고 있는데[6,11]. Cinnamic acid 4-hydroxylase는 고등식물의 다양한 phenolic compounds 생합성에 중요한 역할을 하는 가수분해 효소이다. 이 효소는 trans-cinnamic acid

를 trans-p-coumaric acid로 전환시키는 역할을 하며 환경자극에 강하게 반응한다[8,17]. 특히, 고등식물의 경우 이러한 환경자극에 의해 DNA, proteins, membrane 등이 직접적인 영향을 받게 되는데 일반적으로 UV자극을 받으면 flavonoid와 sesquiterpene을 생합성한다고 보고되고 있다[16]. 그리고 sesquiterpene cyclase는 고추(*Capsicum annum* L.)의 중요 phytoalexin의 하나인 capsidiol 합성에 중요한 역할을 하는 효소이다. Capsidiol은 고추의 잎이나 줄기 등에서 병원균이나 UV 등의 환경 스트레스에 의해서 생성되어 항균작용과 항스트레스 작용을 함으로써 식물체의 방어기작 관련 물질로 알려져 있다[10].

본 연구에서는 식물의 다양한 phenolic compounds의 생합성에 중요한 역할을 하는 C4H (Cinnamic acid 4-hydroxylase) gene을 환경스트레스에 특이적으로 발현하는 specific promoter (sesquiterpene cyclase promoter)와 fusion시켜 식물체에 도입함으로써 환경스트레스 극복에 기여할 수 있는 phenolic compounds 생합성의 자가 조절이 가능한 식물체를 개발하고자 하였다. 이들 유전자가 도입된 담배의 형질전환체의 관련형질을 조사함으로써 환경친화형 작물육성의 가능성을 구명하였다.

재료 및 방법

유전자 클로닝

고추에서 스트레스에 반응하는 sesquiterpene cyclase promoter를 담배에서 발현시키기 위하여 먼저 plant expression vector인 pIG121-Hm vector에 각 promoter부위와 C4H gene

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5707, Fax : +82-53-958-6880

E-mail : dhshin@knu.ac.kr

을 클로닝하였다. CaMV 35S promoter부위는 *Hind*III, *Bam*HI 으로 잘라내고 sesquiterpene cyclase promoter 3, 4, 6, *cyc*600을 클로닝하였으며, GUS coding 부위는 *Bam*HI, *Sac*I 으로 잘라내고 C4H coding region을 클로닝하였다(Fig. 1).

담배 형질전환

고추에서 얻은 sesquiterpene cyclase promoter-C4H 유전자를 heterologous organism인 담배에서 발현시켰다. 담배 종자(*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi)를 50개 정도를 선택하여 멸균된 E-tube에 넣고 2% NaOCl (1ml)을 첨가한 후 10분간 흔들면서 살균하였다. Clean bench에서 NaOCl을 버리고 멸균수로 5회 이상 씻어서 NaOCl을 완전히 제거한 다음 이를 MS배지[25]에 파종하였다. 파종 후 2~4주정도 키운 다음 식물이 양호한 어린 잎을 골라 시료로 사용하였다.

시료로 선택한 잎은 1 cm²로 잘라 상처를 낸 후 binary vector pIG121-Hm으로 형질전환된 *disarmed-agrobacterium* EHA101 배양액에 넣고 10분간 흔들어주며 공조배양 하였다. 이를 callus induction media (4.4 g/L MS salt, 30 g/L sucrose, 2.0 mg/L BA, 0.2 mg/L IAA) 위에서 이틀간 28℃, 암 상태로 키웠다. *Agrobacterium*의 over-growth를 막기 위해 멸균수로 5회 이상 세척한 후 멸균된 여과지위에서 담배 잎을 말리고 물기가 완전히 제거된 담배 잎을 shoot induction media (4.4 g/L MS salt, 30 g/L sucrose, 2.0 mg/L BA, 0.2 mg/L IAA, 10 mg/L Hygromycin, 300 mg/L Carbenicillin)에 치상한 후, 3~5주 동안 28℃, 24시간 연속 광(8,000 Lux) 상태의 성장실 조건에서 배양하였다.

잎, 줄기가 형성된 완전한 식물체는 root induction media (4.4 g/L MS salt, 30 g/L sucrose, 300 mg/L Kanamycin, 10 mg/L Hygromycin, 300 mg/L Carbenicillin)에 옮겨다. 그리고 완전히 뿌리가 형성되면 배양토(peatmoss:vermiculite=1:1)로 옮겨 2일간 순화시킨 다음 생육시켰다.

GUS histochemical assay

GUS 분석을 위하여 자른 식물 조직을 staining mix (50 mM Sodium phosphate (pH 7.0), 2 mM X-glucuronide, 1% Triton X-100)에 넣고 37℃에서 overnight (12hr이상)처리하였다. 처리한 조직을 fixation mix (5% absolute ethanol, 5% acetic acid, 10% formaldehyde)에 넣고 37℃, 2시간동안 처리하였다. Chlorophyll을 완전히 제거하기 위하여 70% absolute ethanol로 3회 이상 세척하였다. 세척된 조직을 배지 위에 올려 실제 현미경으로 관찰하였다(×64).

PCR 반응 조건 및 PCR 산물의 cloning

PCR 반응은 1 ul Taq (5 U/ul), 1 ul dNTP (2.5 mM), 5 ul 10X PCR buffer, 1 ul primer (0.05 uM), 1 ul template DNA (ng/ul), 41 ul 초순수 몰로 전체 volume이 50 ul가 되도록 처리하였다. PCR 반응은 MJ research사의 minicycler를 사용하여, 94℃ 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94℃ 1분간 denaturation, 60℃에서 1분20초간 annealing, 72℃에서 1분간 polymerization으로 35 cycle 반응시킨 후 72℃에서 7분간 post-elongation 시켜 PCR 산물을 얻었다.

Southern blotting 분석

Southern blotting 분석을 위해 담배의 total genomic DNA를 분리한다. 담배 잎 조직을 약 0.5 g을 채취하여, 액체 질소 하에서 막자사발을 이용하여 미세하게 분쇄한 다음 여기에 조직이 녹지 않게 10 ml의 extraction buffer (100 mM Tris-Cl/pH 8.0/, 50 mM EDTA /pH 8.0/, 50 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol)를 넣었다. 20% SDS 1 ml을 첨가하고 65℃ water bath에 10분간 반응시켰다. SDS와 부서지지 않은 조직을 분리하기 위하여, 5 M potassium acetate (salt)를 넣어서 얼음에 20분간 처리 하였다. 12,000 rpm으로 15분간 초고속 원심분리한 후, Miracloth filter를 이용하여 상등

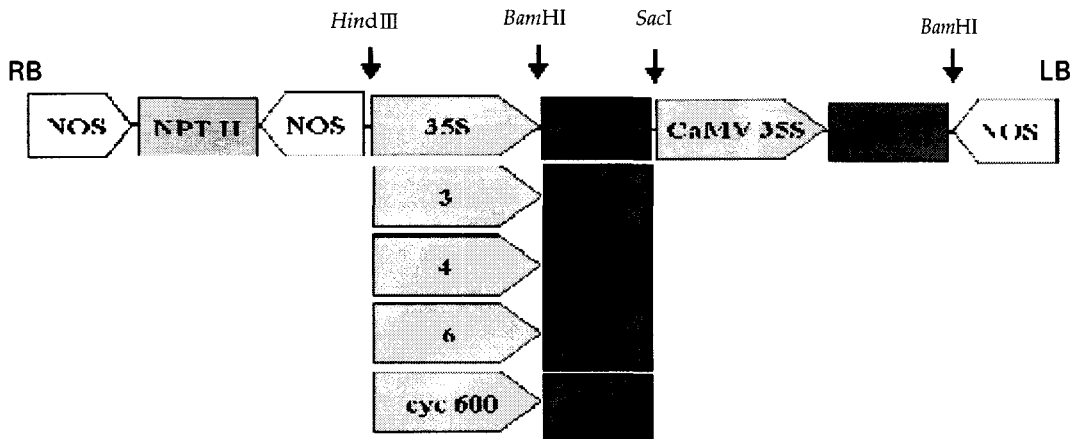


Fig. 1. The C4H gene cassettes with specific promoters in pIG121-Hm. CaMV 35S promoter was used as control. 3, 4, 6, *cyc*600: sesquiterpene cyclase promoter.

액을 걸러 내었다. 여기에 10 ml의 isopropanol을 더 첨가하여 영하 20°C에서 30분간 반응시켰다. 다시 원심분리하여 DNA pellet을 모은다. 모아진 pellet을 TE buffer (50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA) 700 ml에 녹이고 이에 RNA를 제거하기 위해 RNase를 37°C에서 1시간 처리한다. 같은 양의 phenol을 이용하여 순수한 DNA만을 모은다. Phenol 처리는 3회 반복한 다음 2배의 100% ethanol로 pellet을 세척해 주었다. 그런 다음 70% ethanol로 세척을 1회 반복하고 DNA pellet을 완전히 말린다. 잘 말린 DNA pellet을 TE buffer로 녹이고 제한 효소를 처리한다. 제한 효소 *Hind*III, *Pst* I 으로 절단한 후 37°C에서 12시간동안 충분히 DNA를 반응시켰다. 이때 사용되는 제한 효소는 DNA양의 2배가 되는 unit을 사용하였고 0.8% agarose gel에서 10시간 전기영동 하였다. blotting을 위해, gel을 멸균수로 씻어 낸 후 0.25 N HCl에 담구어 20분간 rocker로 흔들어 주어 DNA를 depurination 하였다. 다음으로 denaturation buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 30분간 담구어 gel을 denaturation 시켰으며, neutralization buffer (1.5 M NaCl, 0.5M Tris-HCl/pH 7.4/, 1 mM EDTA)에서 30분간 두어 neutralization 시켰다. 처리한 gel은 blotting buffer (20X SSC)로 씻어 낸 후 semi-dry electroblotting units (V10-SDB, SCIE-PLAS)을 이용하여 nylon membrane (Hybond N+, Amersham)에 약 6시간동안 transfer시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 UV crosslink시켰다. Probe로 사용할 DNA는 95°C에서 5분간 denaturation 시킨 후 얼음에 3분간 quick chilling 하였다. [α -³²P] dCTP labelling은 Random Priming DNA labelling Kit (Amersham)를 사용하여 probe를 제작하였다. Hybridization은 Denharts hybrid solution을 사용하여 65°C에서 2시간 prehybridization하였고 probe를 첨가하여 12시간동안 hybridization 시켰다. Hybridization이 끝난 후 membrane을 2X SSC, 0.1% SDS로 20분간 2회 세척하고, 0.2X SSC, 0.1% SDS로 20분간 2회 세척하여 X-ray 필름에 1주일간 expose시켰다.

C4H 효소활성 측정

잘 자란 담배 0.5 g을 액체 질소에 넣고 막자사발을 이용해 곱게 마쇄한 후 extraction buffer (50 mM tricine (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.3 M mannitol, 0.1% BSA, 10% PVP) 1 ml을 첨가한다. 이를 e-tube에 옮겨 vortexing한다. 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 pipet을 이용하여 상등액을 새로운 tube로 옮긴다. 이를 다시 위와 같은 방법으로 원심분리하여 상등액을 모은다. Microsome을 얻기 위해 sample을 18,000 rpm 1시간동안 원심분리한다. 상등액을 제거하고 아래의 침전물을 resuspend buffer (10 mM potassium phosphate/pH 7.5/, 0.3 M mannitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 15% glycerol)를 넣고 pipet을 이용하여 녹인다. 이때 모든 sample의 양이 동일하게 Bradford 방법을 이용하여 양

을 조절한다. 이렇게 얻은 sample에 reaction buffer (50 mM tricine/pH 7.5/, 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 0.1 mM ascorbic acid, 2 mM trans-cinnamic acid, 0.5 mM NADPH) 1 ml을 넣고 30°C에서 30분간 반응시킨다. reaction을 멈추기 위해 6M HCl 100 μ l를 넣고 섞은 후, 6M NaOH 100 μ l를 더 넣어 pH를 맞춘다. Spectro-photometer를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정한다.

결과 및 고찰

Sesquiterpene cyclase promoter-C4H 유전자 클로닝

Binary vector pIG121-Hm vector에 클로닝된 sesquiterpene cyclase promoter - C4H를 *Hind*III, *Sac*I으로 잘라내어 각 promoter별 size를 확인할 수 있었다. C4H gene의 size가 약 1.5kb이고 각 promoter 3 (0.4kb), 4 (0.3kb), 6 (0.3kb), cyc600 (0.6kb)로 확인되었다[1].

Sesquiterpene cyclase promoter와 β -glucuronidase (GUS) gene을 fusion한 결과 UV stress에 더 많은 GUS 발현 양을 보이며 스트레스에 반응하는 것으로 보아[1] 이 promoter를 사용하여 스트레스가 주어졌을 때 더 많은 C4H gene expression을 기대하였고 stress에 특이적으로 발현하는 promoter 부위 3, 4, 6과 스트레스에 아주 민감하게 반응하는 promoter cyc600 [26]을 대조군으로 사용하여, 형질전환 된 담배에 스트레스를 가하여 C4H 발현량을 조절하고자 하였다. 지금까지는 보통 CaMV 35S promoter를 이용하였고, 이는 과도한 발현으로 부작용을 가져오기도 하였다[2]. 그렇기 때문에 본 연구에서는 stress 특이적으로 발현하는 promoter를 이용하여 stress방어 작용을 나타내는 것으로 알려진 C4H 유전자의 발현[1]을 조절하고자 하였다.

Agrobacterium 형질전환

담배에서 *Agrobacterium*을 사용하여 leaf-disc방법으로 형질전환 실험을 하기 위하여, GUS를 report gene으로 사용하는 pIG121-Hm vector를 사용하였다(Fig. 1). 이 vector의 35S promoter와 GUS부위를 잘라내고 sesquiterpene cyclase promoter-C4H construct를 cloning하였다. 이렇게 재조합된 binary vector를 disarmed *Agrobacterium* EHA101에 freeze-thaw방법[4]으로 도입한 뒤, 여러 transformant중에서 plasmid DNA를 분리하여 Southern blot 분석으로 형질전환 여부를 확인하였다.

C4H 유전자 담배에서 발현

본 실험에서는 defense 기능을 가진 C4H 유전자를 stress response sesquiterpene cyclase 유전자의 promoter부분과 fusion하여 담배에서 발현시켰다. 담배의 형질전환은 이미 오래 전에 그 기법이 개발되어 잘 확립되어 있는 방법이다

그 중 leaf-disc 방법을 택하여 형질전환을 시도하였다. 담배 잎과 *Agrobacterium*을 공조배양 시킨 후 이틀간 암 상태에서 callus를 유도하였으며, *Agrobacterium*의 over-growth를 막기 위해 5회 이상 3차 증류수에 세척하였다. 그 후 hygromycin 10 mg/l이 첨가된 shoot유도 배지에서 3주 이상 배양하였다 (Fig. 2-C). 처음 공조배양 시킨 sample 중 약 77%의 leaf disc에서 callus가 유도되었으며, 그 중 80%이상이 shoot형성을 보였다. 마지막으로 kanamycin과 hygromycin저항성을 가진 최종 형질전환체를 각 promoter당 20 line을 확보할 수 있었다(Fig. 2). 이 때 형질전환의 효율은 각 promoter별로 약간의 차이는 보였으나, Table 1.에서 나타낸 바와 같이 평균 16.4% (leaf-disc: transgenic plants=200: 33)정도로, 이는 일반적인 담배의 형질전환에서 보이는 효율임을 알 수 있었다

형질 전환된 담배의 GUS histochemical assay

본 연구에서 얻게 된 최종 형질전환체의 분석을 위하여 sesquiterpene cyclase promoter-GUS constructs로 이루어진

gene을 가진 담배 형질전환체에 GUS histochemical 분석함으로써, sesquiterpene cyclase promoter의 작동 여부를 조사하였다.

Sesquiterpene cyclase promoter-GUS gene으로 형질전환된 담배의 callus와 잎, 뿌리를 X-glucuronide가 첨가된 시약으로 12시간 염색시킨 다음, fixation mix를 넣고 2시간동안 고정화 하였다. 따라서 GUS gene이 발현된 것을 알 수 있었다(Fig. 3). Callus와 잎에서 GUS 분석을 하였을때 GUS gene이 발현됨을 모임으로써 promoter가 정상적으로 작동함을 확인하였다.

형질전환된 담배의 PCR 확인

최종적으로 얻게 된 형질전환체를 보다 정확하고 빠른 시간 내에 많은 양을 분석하기 위하여 PCR 방법으로 형질 전환체를 분석하였다. 형질전환체에 클로닝된 NPT II (neomycin phosphotransferase) gene을 primer로 사용하였고 94℃ 1분, 60℃ 20초, 72℃ 1분을 35 cycle로 반응시켰다. NPT-II gene은 binary vector pIG121-Hm의 선택 표지로서 PCR에 의해

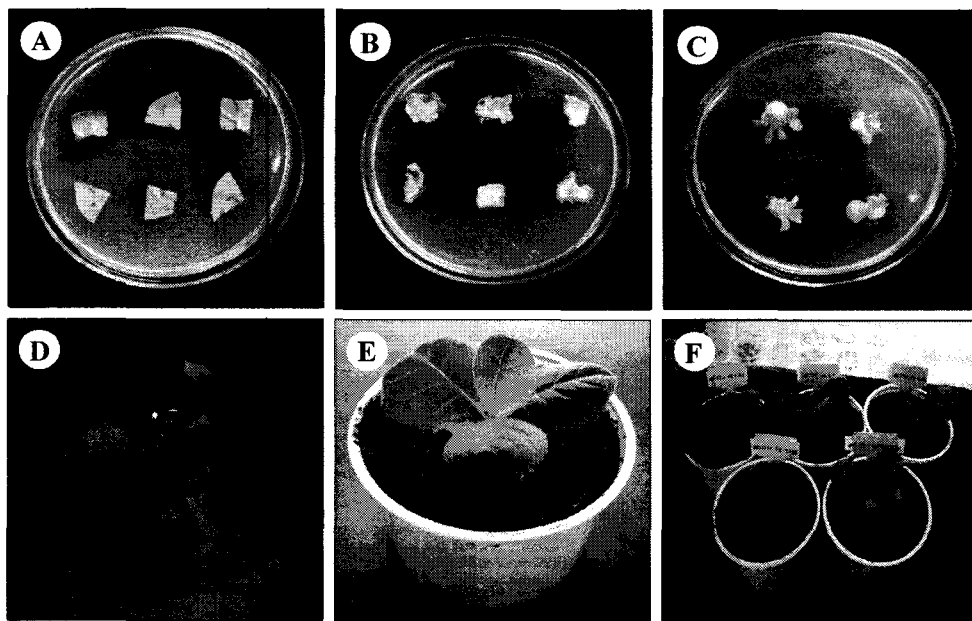


Fig. 2. Regeneration of transgenic tobacco plant.

A : Cocultivation with *Agrobacterium*, B : Callus induction, C : Shoot induction, D : Root induction, E, F : Transgenic tobacco in pot.

Table 1. Development of transgenic plant with CASC-C4H gene constructs

Gene constructs	Plant growth rate	No. of leaf-disc(A)	Induction of calli.(%)	No. of transgenic plant(B)	Rate of transgenic plant(B/A %)
pIG121-3-C4H		200	88.3	24	12.0
pIG121-4-C4H		200	82.5	42	21.0
pIG121-6-C4H		200	73.3	28	14.0
pIG121-cyc600-C4H		200	75.8	45	22.5
pIG121-35S-GUS		200	65.8	25	12.5

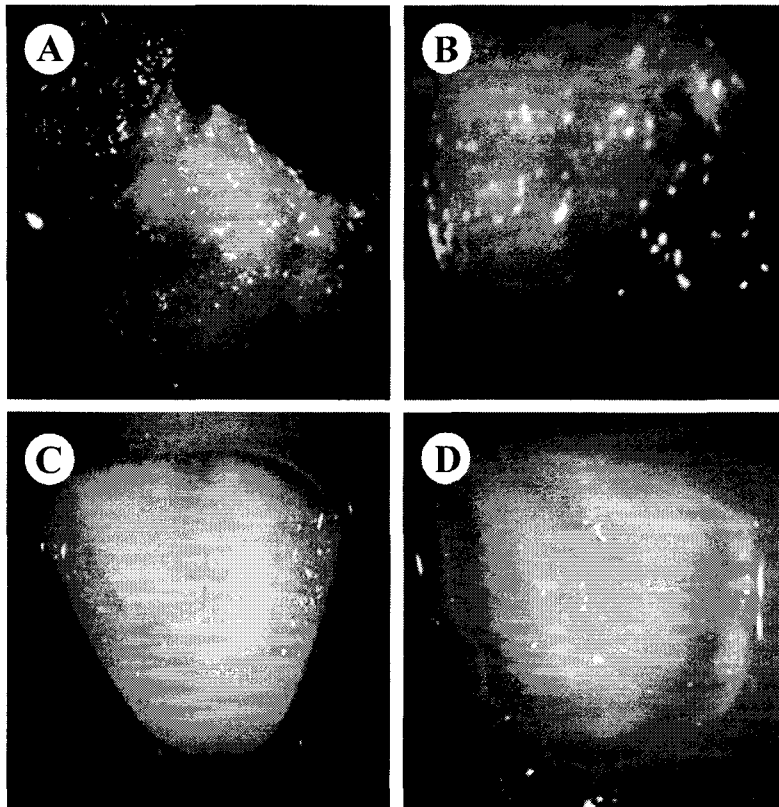


Fig. 3. Histochemical localization of GUS expression in transgenic plants containing the CASC-GUS constructs. A, B : callus, C, D : leaf

amplify되며 간접적으로 T-DNA 형질전환됨을 확인할 수 있었다. C4H activity 조사시 stress를 주지 않았을 때 대조구가 비슷한 양상을 나타내었다. Stress를 주었을 때 대조구와 비교하여 3 promoter는 1.3배 activity가 높아졌으며 4번은 1.4배, 6은 2배, cyc600은 1.1배 높아졌다. 이런 것으로 보아 이 promoter들은 UV에 response하는 promoter이며 앞으로 stress에 저항하는 유전자의 promoter로써 유용하다고 사료된다. CASC-C4H construct로 형질전환된 개체는 NPT II gene의 일부인 553 bp size의 bands를 나타내어 PCR로 각 형질 전환체를 확인하였다(Fig. 4).

형질전환된 담배의 Southern blotting 분석

GUS histochemical assay와 PCR을 통해 확인된 담배 형질전환체에 대하여 Southern blot 분석으로 형질전환 여부를 조사하였다. 먼저 형질전환체의 genomic DNA (15 µg)을 분리한 다음 제한 효소 *Hind*III, *Pst* I으로 절단하고 0.8% agarose gel에서 전기영동 하였다. Size fraction된 DNA를 nylon membrane으로 bolting 시키고 NPTII gene을 probe로 사용하여 Southern blot 분석하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 lane 1은 대조구이며, lane 2, 3, 5, 7, 9는 약 1kb에서 positive signal을 보여 형질전환체임이 확인되었다(Fig. 5).

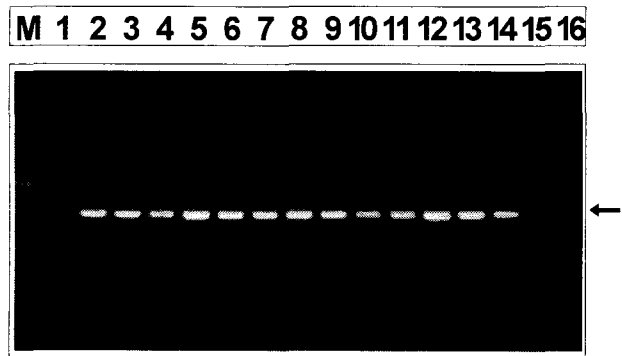


Fig. 4. Detection of NPT II gene from transgenic tobacco lines by genomic PCR. M : KB-Ladder marker, Lane 1 : wild type (control), Lane 2~5 : -3 - C4H construct, Lane 6~9 : -4 - C4H construct, Lane 10~13 : -6 - C4H construct, Lane 14~16 : cyc600 - C4H construct, The arrow indicates 553 bp.

형질전환된 담배의 C4H 효소활성 측정

C4H는 고등식물의 다양한 phenolic compounds 생합성에 있어 중요한 역할을 하는 가수분해 효소이다. C4H enzyme은 다양한 defense에 관련된 key enzyme인 것으로 밝혀졌다[1]. 클로닝된 형질전환체에 sesquiterpene cyclase-C4H gene으로 형질전환된 전환체는 UV등의 환경 스트레스



Fig. 5. Genomic Southern blot hybridization of transgenic tobacco.

The total genomic DNA (15µg) was digested with *Hind* III and *Pst* I, separated on 0.8% agarose gel, transferred on a nylon membrane, and hybridized with NPT II probe. The arrow indicates about 1 kb.

에 강하게 반응하여 무처리에 비해서 UV를 쬐어준 후 12시간이 지났을 때의 반응이 강하게 나타나는 것을 볼 수 있다. 이와 같은 스트레스에 대한 반응은 시간이 경과함에 따라 가속될 것이라 예상되었다(Fig. 6).

Sesquiterpene cyclase-GUS로 형질전환된 담배는 UV stress를 주었을 때 promoter 3번의 경우는 GUS 발현량이 대조구에 비하여 약 1.3배 높아졌다고 보고 되었다[1]. 이런 결과를 미루어 UV에 response 하는 promoter라고 가정할 경우 C4H gene의 발현 량도 UV에 조사에 의하여 높아질 것으로 기대하였다. 그러나 이런 경우는 담배에 이미 intact 한 C4H gene이 존재하고 정상적으로 발현하기 때문에 feed back inhibition도 가정하였다. 그러나 스트레스 환경에서 일반적으로 C4H activity가 증가하는 것으로 알려져, feed back inhibition은 크게 문제가 되지 않을 것으로 사료되었다. 본 연구에서는 CASC 3, 4, 6으로 형질전환된 담배에 UV를 조사하여 12시간 후에 C4H activity를 조사하였다. C4H activity 조사시 stress를 주지 않았을 때 대조구와 비슷한 양상을 나타내었다. Stress를 주었을 때 대조구와 비교하여서는 3 promoter는 1.3배 activity가 높아졌으며 4번은 1.4배, 6은 2배, cyc 600은 1.1배 높아졌다(Fig. 6). 이런 것으로 보아 이 promoter들은 UV에 response하는 promoter이며 앞으로 stress에 저항하는 유전자의 promoter로써 유용하다고 사료된다.

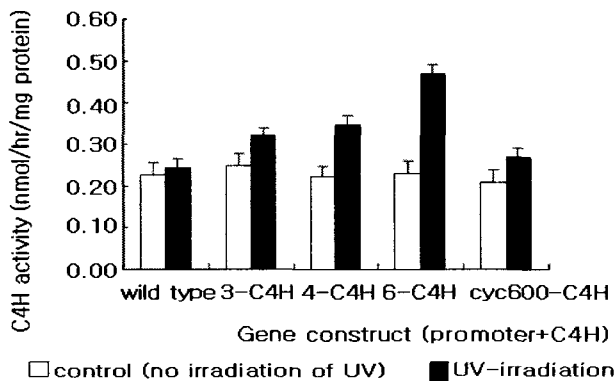


Fig. 6. C4H enzyme activities in transgenic tobacco after UV-irradiation.

요 약

고추에서 클로닝된 sesquiterpene cyclase (CASC) promoter에 cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) 유전자를 클로닝하여 담배에 형질전환하였다. 형질전환체의 분석은 PCR, Southern blot 분석으로 하였으며, CASC promoter의 작동 여부를 조사하기 위하여 GUS histochemical assay를 하였다. 스트레스에 반응한다고 알려진 CASC promoter를 C4H gene과 fusion하여 C4H activity를 조사하여 스트레스에 반응하는 정도를 조사하였다.

최종적인 형질전환체로 확인된 개체는 평균 16.4% 정도였으며, 각 promoter별로 약간의 편차를 보였다. C4H activity 조사 시 스트레스를 주지 않았을 때 대조구가 비슷한 양상을 나타내었다. 스트레스를 주었을 때 대조구와 비교하여 promoter 3번은 1.3배 activity가 높아졌으며 4번은 1.4배, 6은 2배, cyc 600은 1.1배 높아졌다. 이런 결과로 보아 이 promoter들은 UV에 반응하는 promoter이며 앞으로 stress에 저항하는 유전자의 적당한 promoter로, 타작물에 적용하여 stress 저항성 작물의 육성 시 매우 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 한국학술진흥재단 지원 중점연구소 과제(KRF-2000-005-G00002)에 의해 수행되어 감사드리는 바입니다.

참 고 문 헌

1. 강성구. 1999. 고추 (*Capsicum annuum*) Sesquiterpene Cyclase gene의 UV-inducible promoter 특성 구명. 경북대학교 농학과 석사학위논문.
2. 김영희. 1997. 형질전환된 담배식물에서 CaMV 35S promoter element의 발현에 미치는 외부물질들의 영향. 한국원예학회지 **38(3)**, 320-325.
3. Akutsu, M., T. Ishizaki and H. Sato 2003. Transformation of the monocotyledonous *Alstroemeria* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*
4. An, G., B. D. Watson, S. Stachel, M. P. Gordon and E. W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformations of higher plants. *EMBO J.* **4**, 277-284
5. Beggs, C. J., K. Kuhn and R. Boche. 1987. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard. *Planta* **172**, 121-126.
6. Bell-Lelong, D. A., J. C. Cusumano, K. Meyer and C. Chapple. 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in arabidopsis. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol.* **113**, 729-738.
7. Blee, K., J. W. Choi, A. P. O'Connell, S. C. Jupe, W. Schuch, N. G. Lewis and G. P. Bolwell. 2001. Antisense

- and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochemistry*. **57(7)**, 1159-66.
8. Blount, J. W., M. Sameer and L. W. Sumner. 2000. Over-expression of cinnamate 4-hydroxylase leads to increased accumulation of acetosyringone in elicited tobacco cell-suspension cultures. *Planta*. **214(6)**, 902-910.
 9. Blount, J. W., Sameer and L. W. Sumner. 2000. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol*. **122(1)**, 107-116.
 10. Catalina, E. M., A. Dolores and C. Emilia, 1996. Capsidiol :Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to phytophthora. *Physiologia Plantarum*. **98**, 737-742.
 11. Dixon, R. A and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. **7**, 1085-1097.
 12. Franke, R., C. M. McMichael and K. Meyer. 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J*. **22(3)**, 223-234.
 13. Hahlbrock, K. and D. Scheel. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 347-349.
 14. Kang, S. G. 1999. Characterization of UV-irradiation of sesquiterpene cyclase gene in *Capsicum annuum*. The thesis of Graduate School Kyungpook National University.
 15. Kato-Noguchi, H. and T. Ino. 2003. Rice seedlings release momilactone B into the environment. *Phytochemistry*. **63(5)**, 551-554.
 16. Kim, H. Y. and D. H. Shin. 2001. Enzyme activities and compounds related to self-defence in UV-challenged leaves of rice. *The Korean society of crop science* **46(1)**, 22-28.
 17. Kim, M. Y. 2000. Enzyme activity and gene regulation in phenylpropanoid pathway of rice and pepper in response to UV and wounding. The thesis of Graduate School Kyungpook National University.
 18. Kim, J. G., Y. D. Choi and S. U. Kim. 2003. Genetic transformation of *Monascus purpureus* DSM1379. *Biotechnol Lett*. **25(18)**, 1509-1514.
 19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*. **15**, 473-479.
 20. Mizutani, M., D. Ohta and R. Sato. 1997. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from Arabidopsis and its expression manner in planta. *Plant Physiol*. **113(3)**, 755-763.
 21. Rasmussen, S. and R. A. Dixon. 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell*. **11(8)**, 1537-1552.
 22. Rice, E. L. 1984. Allelopathy. *Academic Press. Inc. New York*. **2-4**.
 23. Schoch, G. A., G. N. Nikov, W. L. Alworth and D. Werck-Reichhart. 2002. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. *Plant Physiol*. **130(2)**, 1022-31.
 24. Sewalt, V., W. Ni, J. W. Blount, H. G. Jung, S. A. Masoud, P. A. Howles, C. Lamb and R. A. Dixon. 1997. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-Hydroxylase. *Plant Physiol*. **115(1)**, 41-50.
 25. Xu, Z., D. Guo, L. Yu, M. Zhao, X. Zhang, D. Li, K. Zheng and Y. Ye. 2003. Molecular biological study on the action mechanism of rice allelochemicals against weeds. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. **14(5)**, 829-833.
 26. Yin, S., L. Mei, J. Newman, K. Back and J. Chappell. 1997. Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. Characterization of an elicitor and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiol*. **115(2)**, 437-451.